

PEMBENTUKAN KALUS DAN EMBRIOGENESIS KULTUR PELEPAH DAUN DAN DAUN *Caladium* HIBRIDA

[Callus formation and embryogenesis of petiole and leaf cultures of *Caladium* hybrid]

Irawati

Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor
Jl. Ir. H. Juanda 13, Bogor 16122

ABSTRACT

Petiole and leaf cultures of *Caladium* hybrid were grown on MS medium+ 1ppm 2,4-D and transplanted to MS medium + 1 ppm NAA and then were grown on MS media with or without Kinetin and NAA. The greatest capacity of explants to produce callus was from the base cut and the top cut of the petioles as well as from the main vein of the leaf. Compact calli were grew further into adventive buds and plantlets. Through Scanning Electron Microscope, the development of adventive buds were observed grew from the parenchymatous cells and the vascular bundles.

Kata kunci: Embriogenesis, kultur pelepah daun, kultur daun, *Caladium* hibrida.

PENDAHULUAN

Usaha untuk menginduksi plantlet dari bagian-bagian tumbuhan berdasar konsep *totipotency* seringkali sangat terbatas hasilnya. Kemampuan suatu tumbuhan menghasilkan tunas adventif beragam antar jenis, bahkan antar tumbuhan dari jenis yang sama (Huges, 1981). Di dalam suatu tumbuhan, kemampuan regenerasi dari jaringan yang berbeda tidak hanya tergantung pada umur fisiologisnya, tetapi sampai ke tingkat karakterisasi dan kualitas selnya. Jaringan yang muda umumnya mempunyai kemampuan berdiferensiasi lebih baik. Sedangkan ukuran eksplan, suhu, cahaya, waktu inokulasi (pada musim yang berbeda), jenis medium atau zat pengatur mempengaruhi pertumbuhan eksplan (Tisserat, 1985). Hasil terbaik dicapai jika sel, jaringan atau organ yang sesuai dikulturkan pada medium dan lingkungan yang sesuai.

Selain meristem pucuk, bagian tumbuhan lainnya seperti tangkai daun muda atau daun muda juga dipilih karena berbagai alasan. Kedua bagian tumbuhan tersebut juga mempunyai potensi untuk dikulturkan, terutama jika pemotongan pucuk menyebabkan pertumbuhan tanaman selanjutnya menjadi terhambat, seperti halnya tangkai daun muda *Eryngiumfoetidum* yang merupakan sumber eksplan potensial dalam perbanyakan (Mohamed-Yasseen, 2002).

Bahan-bahan seperti bahan organik atau zat pengatur tumbuh (ZPT) yang ditambahkan ke medium biasanya diperlukan untuk menginduksi tunas adventif (Pierik et al., 1974). Penambahan ZPT yang dikenal dapat mengurangi dominansi pucuk dan polaritas kalus yaitu 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) pada kultur *Colocasia esculenta* var. *antiquorum* dapat mengurangi tunas yang abnormal yang sebelumnya ditumbuhkan pada medium Linsmaier-Skoog (LS) dengan penambahan adenin-N-benzyl-9-tetrahydro-2H-pyran-2-yl atau penambahan 6-dimethylaminopurine dan NAA (Nyman et al., 1984). Pada kultur pelepah daun *Colocasia esculenta* var. *esculenta*, kalus yang remah dan akar berhasil ditumbuhkan dari pelepah daun yang masih sangat muda pada medium MS dengan atau tanpa penambahan NAA dan Kinetin (Irawati et al., 1983). Pada perbanyakan *Xanthosoma violaceum* secara *in-vitro* oleh Nguyen et al. (1987), terbukti bahwa peran auksin dan sitokinin sangat besar.

Pemilihan bagian dari tumbuhan yang akan dikulturkan juga penting. Pengamatan bagian dari tumbuhan yang dapat menumbuhkan tunas adventif serta zat pengatur tumbuh yang dapat menginduksinya dilakukan dalam penelitian ini. *Caladium* hibrida dipilih sebagai bahan tanaman di samping berpotensi sebagai tanaman hias juga dapat mewakili cara perbanyakan vegetatif bagi hibrida terseleksi dari kelompok tumbuhan ini.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagian dari pelepah daun dan bagian dari daun *Caladium* hibrida yang mempunyai kemampuan menumbuhkan plantlet serta mencari medium tumbuh yang sesuai untuk perbanyakannya secara *in-vitro*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan tanaman

Caladium hibrida dewasa (*Caladium 'Elizabeth Lou'* self) yang ditumbuhkan dari biji berasal dari Hawaii. Pelepah muda dengan daun yang masih menggulung (panjang ± 3 cm dan garis tengah pangkal pelepah 1 cm) dipotong dari pucuk tanaman. Sterilisasi bahan tanaman adalah dengan larutan H₂O₂ 50% atau 100% selama 10-20 menit, kemudian dibilas dengan air suling steril 3 - 4 kali. Eksplan pelepah daun dipotong melintang ± 3 mm (silinder) dan juga dibelah dua membujur (½ silinder). Eksplan diletakkan horizontal di atas permukaan medium. Eksplan daun diletakkan mendatar (menghadap ke atas) pada permukaan medium. Urutan irisan pelepah dari pangkal ke arah pucuk dicatat untuk melihat bagian mana dari pelepah daun yang mempunyai potensi sebagai eksplan.

Media

Untuk inokulasi digunakan medium dasar Murashige and Skoog (MS) (1962) yang mengandung 30 gram/liter sukrosa dan 10 gram/liter Bacto Agar + 1 ppm 2,4-D. Setelah 3 bulan kultur dipindahkan ke medium yang sama. Kultur yang tumbuh dipindahkan ke medium MS + 1 ppm NAA sebanyak dua kali. Untuk meningkatkan pertumbuhan kultur sembilan macam media (Tabel 1), dengan berbagai kadar NAA dan Kinetin yaitu sebagai berikut:

Tabel 1.

Perlakuan	NAA		
	0 ppm	0,1 ppm	1,0 ppm
Kinetin	Oppm	a	b
	0,1 ppm	d	e
	1,0 ppm	h	i

Catatan: Semua media diatur keasamannya (pH): 5,1 - 5,2 sesuai dengan Hartman (1974).

Jumlah irisan eksplan pelepah daun maupun eksplan helai daun pada sembilan media pindahan tidak sama karena ukuran awal bahan tanamannya (pelepah dengan daun muda yang masih menggulung) tidak sama.

Lingkungan tumbuh

Kultur diinkubasikan di ruang kultur pada suhu 24° ± 4°C, dibawah lampu dengan intensitas ± 1200 Lux ("Life Line" Sylvana) selama 12 jam/hari. Pertumbuhan eksplan membentuk kalus dan tunas adventif diamati dengan mempergunakan Scanning Electron Microscope (SEM)

HASIL

Eksplan pelepah daun membesar setelah beberapa minggu. Beberapa eksplan mengeluarkan senyawa fenol sehingga harus dipindahkan ke medium yang segar agar dapat tumbuh lebih lanjut. Eksplan tidak menunjukkan perbedaan regenerasi pada sembilan macam media yang dicoba, artinya kalus remah dan kalus embrionik yang kemudian tumbuh menjadi plantlet dijumpai pada semua media jika eksplan berasal dari pangkal atau pucuk pelepah daun. Sedangkan eksplan yang berasal dari bagian tengah pelepah daun tidak menumbuhkan kalus embrionik, jika menumbuhkan kalus juga sangat terbatas jumlahnya (sedikit).

Eksplan daun tumbuh melebar setelah diinokulasikan ke atas medium Murashige and Skoog (MS) yang mengandung 30 gram/liter sukrosa dan 10 gram/liter Bacto Agar + 1 ppm 2,4-D. Warnanya memucat dan lembar daun tampak menjadi lebih tipis. Potongan daun ini menunjukkan pertumbuhan pada urat daunnya, terutama pada urat daun utama. Seperti halnya pada kultur pelepah daun, pertumbuhan kultur daun juga tidak menunjukkan pertumbuhan yang berbeda pada sembilan jenis media yang dicoba, artinya pada semua media hanya eksplan yang mempunyai urat daun utama yang dapat menumbuhkan plantlet.

Eksplan pelepah daun tumbuh lambat setelah membesar demikian pula eksplan daun setelah melebar. Setelah berumur satu bulan, kalus dan tunas adventif dijumpai pada sembilan macam media yang dicoba.

Pada pengamatan dengan *Scanning Electron Microscope* tampak bahwa kultur pelepah daun dapat menghasilkan kalus, baik pada irisan melintang maupun irisan membujurnya. Pangkal pelepah daun dan pucuk pelepah daun (pangkal daun) mempunyai kemampuan menghasilkan kalus yang lebih besar dibandingkan dengan bagian tengah dari pelepah daun. Kemampuan menghasilkan kalus ini menurun dari pangkal pelepah daun ke bagian tengah dan meningkat kembali ke arah pucuk pelepah daun.

Kalus yang remah tumbuh di semua permukaan irisan eksplan pelepah daun. Sebanyak 10% dari eksplan menumbuhkan kalus yang kompak membulat (Foto 1) dan kemudian tumbuh menjadi tunas adventif (Foto 2). Kalus yang kompak membulat ini selalu tumbuh pada permukaan irisan, tidak pada permukaan pelepah yang utuh. Tunas adventif tampak tumbuh dari sel-sel parenchyma dari jaringan pembuluh yang menjadi meristematik sifatnya.

Pertumbuhan tunas adventif ini pada awalnya tidak dipengaruhi oleh geotropisme atau fototropisme (tidak beraturan arahnya), tetapi setelah daun pertama tumbuh sifat pertumbuhan yang normal mulai tampak dan selanjutnya plantlet tumbuh dengan cepat.

Hanya 10% kultur daun yang dapat tumbuh. Kultur lembar daun yang terbaik dijumpai pada kultur daun bagian pucuk dengan urat daun utamanya. Kultur ini menumbuhkan kumpulan kalus yang kompak dan membulat pada pangkal irisannya dan menumbuhkan tunas (Foto 3) serta akar (Foto 4).

PEMBAHASAN

Tumbuhnya kalus yang kompak dan membulat di antara kalus yang remah atau pada permukaan irisan adalah kunci awal dari tunas adventif yang selanjutnya tumbuh menjadi plantlet. Tipe kalus yang potensial ini hanya tumbuh dari bagian kultur yang terluka karena irisan. Hal yang sama dijumpai pada kultur daun *Anthurium andraeanum* yang ditumbuhkan pada medium *Vi* MS dengan penambahan 1,11 μ M Benzyl Adenine, 1,14 μ M IAA dan 0,46 μ M Kinetin, yang tidak menumbuhkan kalus yang remah (Martin *et al.*, 2003). Berbeda dengan kultur daun kacang tanah yang dilakukan oleh Venkatachalam *et al.* (1999), penambahan auksin dan sitokinin sangat jelas

pengaruhnya terhadap pertumbuhan embrio somatik. Pada kultur *Caladium* hibrida ini pengaruh auksin dan sitokinin yang dicoba baik pada saat inisiasi maupun pertumbuhan kultur selanjutnya tidak menunjukkan perbedaan.

Asal eksplan pelepah daun (di bagian pangkal, tengah atau pucuk) juga memegang peranan penting untuk dapat menumbuhkan tipe kalus yang dapat tumbuh menjadi tunas adventif. Makin dekat jaraknya dengan pangkal pelepah daun atau makin dekat dengan ujung pelepah daun makin tinggi kemampuannya membentuk tunas adventif, artinya bagian tengah dari pelepah daun potensinya terendah. Sel-sel parenchyma dari jaringan pembuluh pangkal dan pucuk pelepah daun *Caladium* hibrida ini mirip dengan felogen tangkai daun *Lunaria annua* (Magendans, 1988), sel-sel parenchymanya menjadi meristematik ketika terjadi pelukaan/diiris.

Kemampuan beregenerasi dari berbagai kelompok tumbuhan dan bagian-bagian dari tumbuhan jelas dibuktikan pada jenis-jenis Liliaceae, Iridaceae dan Amaryllidaceae (Hussey, 1975). Pada Liliaceae, eksplan yang berasal dari umbi lapis, daun, tangkai bunga maupun bakal buah dapat menumbuhkan plantlet, akan tetapi pada Iridaceae dan Amaryllidaceae eksplan yang berasal dari umbi lapis dan tangkai bunga saja yang dapat menumbuhkan plantlet.

Sedangkan pada kultur tangkai daun dan lembar daun *Pelargonium x hortorum*, morfogenesis tampak di seluruh permukaan potongan tangkai daun (pada *Caladium* disebut sebagai pelepah daun) tetapi pada kultur daun menunjukkan kemiripan yaitu pertumbuhan tunas adventif hanya pada potongan urat daunnya (Agarwal dan Ranu, 2000).

Polaritas dalam tumbuhan dan pada potongan jaringan tumbuhan (eksplan) seringkali tidak sama. Organogenesis jelas dipengaruhi oleh polaritas. Orientasi eksplan pada mediumnya mempengaruhi aliran bahan-bahan di dalamnya termasuk zat pengatur tumbuhnya. Efek polaritas ini dijumpai pada kultur tangkai bunga *Gladiolus*, *Asparagus* dan *Amarylis* hibrida dan potongan batang *Rhododendron*. Pembentukan tunas terbanyak dijumpai jika eksplan diletakkan terbalik pada mediumnya. Efek polaritas ini

tampak pada organogenesis pada Liliaceae (Hughes, 1981).

Pada *Caladium* hibrida yang dicoba, efek polaritas ini tidak tampak karena semua eksplan dicoba diletakkan pada posisi yang sama pada medianya, akan tetapi asal (sumber) eksplan memegang peranan yang lebih penting yang menentukan keberhasilannya membentuk plantlet. Terbukti bahwa pada pelepah *Caladium* hibrida yang masih muda ini, kemampuan bagian pangkal, tengah dan pucuk jelas berbeda. Demikian juga pada helai daun, hanya daun yang mengandung urat daun utama merupakan sumber eksplan yang potensial.

Konsentrasi auksin dalam tumbuhan terdapat pada bagian yang sangat muda dan dialirkan ke bagian tumbuhan yang lebih tua dan ke akar. Karena penyebaran auksin di dalam tumbuhan tidak sama, maka kemampuan bagian tumbuhan yang berbeda juga tidak sama. Pucuk daun, terutama aksisnya (urat daun utama) adalah bagian yang mempunyai konsentrasi auksin lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lainnya. Kemungkinan lain adalah dua sistim pola meristem yang tidak saling berhubungan. Yang pertama adalah pola pangkal-pucuk (*apical-basal pattern*) yang tidak tergantung dari penyebaran auksin. Yang kedua diatur oleh auksin endogen yang menentukan bagian-bagian dari tumbuhan yang dapat menumbuhkan organ (Reinhardt *et al*, 2000).

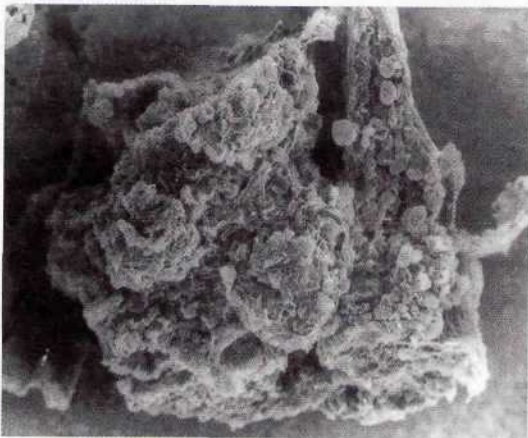


Foto1. Pangkal pelepah daundengan kalus remah dan kompak membulat.

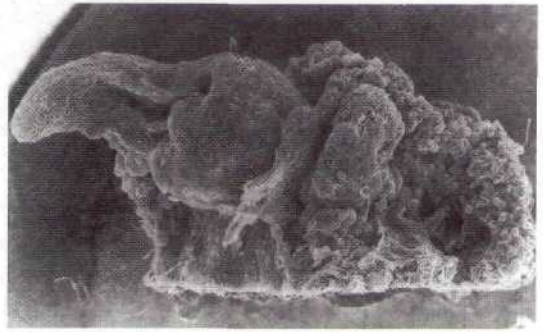


Foto 2. Tunas tumbuh dari pangkal pelepah daun.



Foto 3. Tunas tumbuh pada potongan kultur daun.

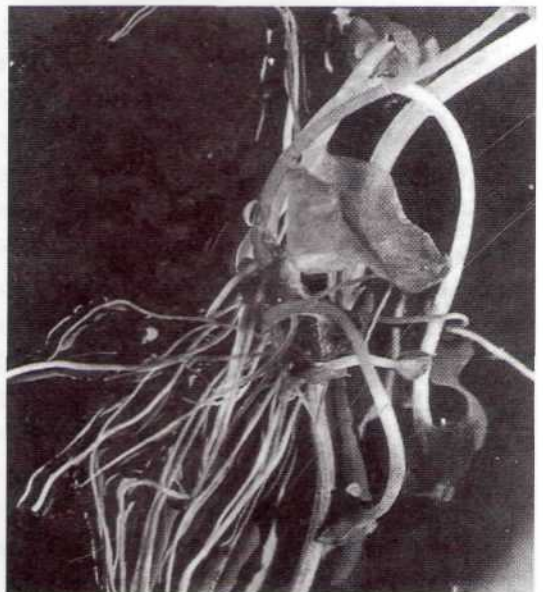


Foto 4. Plantlet tumbuh dari urat pucuk daun.

Di sini terbukti bahwa ZPT yang ditambahkan ke media yang dicoba belum dapat mempengaruhi organogenesis dari kultur *Caladium* hibrida yang dicoba.

KESEMPULAN DAN SARAN

Meskipun hanya 10% dari kultur yang dapat menghasilkan plantlet, akan tetapi cara perbanyakan dari pelepah dan lembar daun *Caladium* hibrida ini membuka peluang untuk perbanyakan tanaman hias sejenisnya tanpa merusak batang utamanya. Perbanyakan secara *in-vitro* ini berpotensi untuk memperbanyak talas-talasan (Araceae) seperti dikemukakan oleh Hyndman *et al.* (1999). Dari hasil ini dapat disarankan penelitian lebih lanjut pada kelompok tumbuhan ini dengan metoda statistik agar dapat diketahui cara perbanyakannya yang paling menguntungkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal PK and Ranu RS, 2000.** Regeneration of Plantlets from Leaf and Petiole Explants of *Pelargonium x hortorum*. *In Vitro Plant* 36(5), 392-397.
- Hartman RD, 1974.** Dasheen Mosaic Virus and Other Pathogens Eliminated from Caladium, Taro and Cocoyam by Culture of Shoot tips. *Phytopathology* 64, 237-240.
- Huges KW, 1981.** Ornamental Species. Dalam: Cloning Agriculture Plants via In Vitro Techniques. BV Conger (Ed.). CRC, Boca Raton, Florida, Him 5-50.
- Hussey G, 1975.** Totipotency in tissue explants of some members of the Liliaceae, Iridaceae, and Amarylidaceae. *J. Exp. Bot.* 23, 253-262.
- Hyndman SE and Bickell A, 1999.** <http://hoya.mobot.org/ias/Horticulture /Tculture/arodmicr.html> (7/19/2005)
- Irawati and Webb KJ, 1983.** Callus Production and Organogenesis from Shoot Tip and Petiole Explants from Six Indonesian Cultivars of *Colocasia esculenta* var. *esculenta*. *Ann. Bogorienses* VII (1), 13-22.
- Magendans JFC, 1988.** Morphogenesis of Primary Vascular Tissue and Regeneration. *Agric. Univ. Wageningen Papers* 88, 4.
- Martin KP, Joseph D, Madassery J and Philip VJ. 2003.** Direct Shoot Regeneration from Lamina Explants of Two Commercial Cut Flower Cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *In Vitro Plant* 39(5), 500-504.
- Mohamed-Yasseen Y, 2002.** *In vitro* Regeneration, Flower and Pant Formation from Petiolar and Nodal Explants of Culantro (*Eryngium foetidum* L.). *In Vitro Plant* 38(5), 423-426.
- Murashige T and Skoog F. 1962.** A Revised Medium for Rapid rowth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nguyen TQ and Nguyen VU, 1987,** Aroids Propagation by Tissue Culture: 1. Shoot Tip Culture and Propagation of *Xanthosoma violaceum*. *HortScience* 22(4), 671-672.
- Nyman LP and Arditti J, 1984.** Effects of 2,3,5-triiodobenzoic acid on Plantlet Formation from Cultured Tissues of Taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schoot (Araceae). *Annals of Botany* 54, 459-466.
- Pierik RLM, Steegmans HM and Van der Meys JAJ, 1974.** Plantlet Formation in Callus Tissue of *Anthurium andraeanum* Lindl. *Sci. Hort.* 2, 193-198.
- Reinhardt D, Mandel T and Kuhlemeier C, 2000.** Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. *Plant Cell* 12(4), 507-518.
- Tisserat B, 1985.** Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. Dalam: Plant Cell Culture, a Practical Approach. RA Dixon (Ed.) IRL, Oxford, 79-105.
- Venkatachalam P, Kavi Kishor PB, Geetha N, Thangavelu M and Jayabalan N, 1999.** A Rapid Protocol for Somatic Embryogenesis from Immature Leaflets of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *In Vitro Plant* 35(5), 409-412.